

10/553947

JC12 Rec'd PCT/PTC 21 OCT 2005

P28635.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Toru MYOGADANI et al. **Mail Stop PCT**

Appl. No: : Not Yet Assigned **PCT Branch**

I. A. Filed : April 23, 2004
(U.S. National Phase of PCT/ P2004/005952)

For : OPTICAL INSPECTION APPARATUS

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop PCT
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2003-120649, filed April 24, 2003. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Toru MYOGADANI et al.


Bruce H. Bernstein

Reg. No. 29,027


Leslie J. Paperner
Reg. No. 33,329

October 21, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日本国特許庁 23.4.2004
 JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 4月24日

REC'D 01 JUL 2004

出願番号 Application Number: 特願2003-120649

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP2003-120649]

出願人 Applicant(s): 株式会社モリテックス

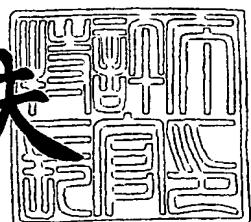
PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 2日

今井康夫



特許庁長官
 Commissioner,
 Japan Patent Office



【書類名】 特許願

【整理番号】 2003042401

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 G01N 21/82

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野南1-3-3
株式会社モリテックス 横浜テクニカルセンター内

【氏名】 茂荷谷 徹

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野南1-3-3
株式会社モリテックス 横浜テクニカルセンター内

【氏名】 達 正 義

【特許出願人】

【識別番号】 000138200

【氏名又は名称】 株式会社モリテックス

【代理人】

【識別番号】 100084984

【弁理士】

【氏名又は名称】 澤野 勝文

【選任した代理人】

【識別番号】 100094123

【弁理士】

【氏名又は名称】 川尻 明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013572

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 濁度測定装置

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプルチューブ内のサンプルの濁度を光学的に測定する濁度測定装置であつて、

サンプルチューブを立てる夫々の配列孔の下から各サンプルチューブに対して光を照射する発光部が設けられた反応プロックと、前記配列孔に並べられた夫々のサンプルチューブを前記反応プロックの側面に形成された観察用透孔を通して撮像する撮像カメラと、前記撮像カメラで撮像された画像データから読み取られる輝度分布又は色度分布に基づき各サンプルの濁度を計測する演算処理装置とを備えたことを特徴とする濁度測定装置。

【請求項2】 前記観察用透孔が撮像カメラのレンズから夫々のサンプルチューブに至る放射線上に形成されている請求項1記載の濁度測定装置。

【請求項3】 前記発光素子が各配列孔の底部に設けられてなる請求項1記載の濁度測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプルチューブ内のサンプルの濁度を光学的に測定する濁度測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

生化学、医学薬学、食品分野等においては、簡易、迅速、精確、安価な遺伝子增幅法が望まれており、このような要請に応え得る新規な遺伝子増幅法として近年LAMP法が注目されている。

このLAMP法は、增幅効率が極めて高いだけでなく、サンプルチューブ内で遺伝子(DNA)を伸長合成させるときに、基質(dNTPs)から遊離されるピロリン酸イオンと反応溶液中のマグネシウムイオンとが結合した副産物であるピロリン酸マグネシウムが多量に生成されて、サンプルチューブ内に白濁・白沈

を生じる。

したがって、この白濁・白沈を観察することにより遺伝子增幅が行われたか否かを簡単に識別することができる。

【0003】図7はこのようなLAMP法における増幅の有無によるサンプルの白濁・白沈の程度を、反応の進行に伴いリアルタイムで検出する濁度測定装置の要部を示す説明図である。

この濁度測定装置31は、反応ブロック32に形成されたサンプルチューブ33を立てる複数の配列孔34…の夫々に、各配列孔34に直交して観察用透孔35…が貫通形成され、各観察用透孔35を透過する光軸上にはサンプルチューブ33に光を照射する発光素子36と、サンプルチューブ33を透過してきた光を検出する受光素子37が配されている。

【0004】これによれば、サンプルチューブ33…に各サンプルをいれて反応ブロック32に並べ、発光素子36から照射されてサンプルチューブ33を透過する光を受光素子37で検出しながら、所定の温度条件で反応させた場合に、遺伝子増幅が進行したサンプルについては白濁・白沈を生じて透過光強度が低下するので、この光量変化に基づいて、白濁・白沈の有無を検出することができる。

【0005】しかし、受光素子37で検出される光強度変化は、サンプルの白濁・白沈による場合だけでなく、発光素子36及び受光素子37の光学特性の変化が考えられる。

すなわち、反応中に発光素子36の光量が低下したり、受光素子37の出力特性が変化すると、サンプルが白濁・白沈しているにも拘らず增幅不十分と誤判断されたり、白濁・白沈していないにも拘らず增幅完了と誤判断されるおそれがある。

特に、反応ブロック32は加熱されるため、その温度の影響を受けて、発光素子36及び受光素子37の光学特性が変化する可能性は高い。

【0006】このため、従来は、発光素子36として光量モニタ付き発光ダイオードを使用して照射光量を一定に維持するだけでなく、反応ブロック32の熱の影響を排除するために発光素子36及び受光素子37を反応ブロック32から離して配置しており、これによれば、熱による光学特性の変化を最小限に抑えるこ

とができる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、発光素子36及び受光素子37を反応ブロック32から離して設置する場合に、8個程度の配列孔34が形成された反応ブロック32においては、発光素子36及び受光素子37を8個ずつ合計16個もの光学素子について光軸合せが必要になるため、装置の組立段階でその光軸合せが非常に面倒であるという問題を生じる。

【0008】また、発光素子36及び受光素子37を反応ブロック32から離せば離す程、各素子36、37に与える熱の影響は少なくなるものの、外部の光の影響を受けやすくなるため、反応ブロック32を設置する暗室を形成しなければならないという面倒もある。

【0009】さらに、受光素子37により透過光強度のみに基づいて濁度を測定するようにしているので、その他の外因、例えば、サンプルチューブ33内に疊り、気泡が形成されてしまうと測定が不正確になる。

しかも、これらは反応中に生ずることが多いため、各素子36、37の光学特性が安定していても、また、反応ブロック32を暗室内に設置していても起こり得る。

【0010】そこで本発明は、このような発光素子の光量変化や、サンプルチューブ内の疊りや気泡に関係なく、サンプルの反応に伴って生じた白濁・白沈の有無を正確に検出でき、しかも、各光学素子の正確な光軸合せを不要にして、組立作業も簡単にできるようにすることを技術的課題としている。

【0011】

【課題を解決するための手段】

この課題を解決するために、本発明は、サンプルチューブ内のサンプルの濁度を光学的に測定する濁度測定装置であって、サンプルチューブを立てる夫々の配列孔の下から各サンプルチューブに対して光を照射する発光部が設けられた反応ブロックと、前記配列孔に並べられた夫々のサンプルチューブを前記反応ブロックの側面に形成された観察用透孔を通して同時に撮像する撮像カメラと、前記撮

像カメラで撮像された画像データから読み取られる輝度分布又は色度分布に基づき各サンプルの濁度を計測する演算処理装置とを備えたことを特徴とする。

【0012】本発明によれば、サンプルチューブの下から光を照射させることにより、白濁・白沈により生ずるサンプル内での光の散乱を観察するようにしている。

例えば、L A N P 法による遺伝子増幅が進行せずサンプルが透明のうちは、下方から照射された光がサンプルチューブ内で散乱しないので、観察用透孔から漏れる光量がほとんどなく、したがって撮像カメラで撮像したときに暗く映る。

また、遺伝子増幅が進んでサンプルが白濁・白沈を起こすと、下方から照射された光がサンプルチューブ内で散乱を起こすので、その散乱光が観察用透孔から漏れ、したがって撮像カメラで撮像したときに明るく映る。

【0013】このとき、撮像カメラでは、全てのサンプルチューブを同時に撮像できるので、観察孔の位置に対応する画像中のエリアを特定することにより、夫々のエリアごとに白濁の有無を検出することができ、どのサンプルが白濁を起こしているかを容易に判定することができる。

【0014】また、撮像カメラで撮像された各サンプルチューブの画像データから読み取られる輝度分布又は色度分布のデータは、単なる数値ではなく、白濁部分の画像上の位置を X Y 座標とし、輝度を Z 座標とする三次元情報として認識される。

したがって、各サンプルチューブを照らす光量が多少変化するようなことがあっても、画像処理を施して閾値を適当に選んだり正規化することにより、光量変化による影響を排除することができ、白濁・白沈の進行状況を正確に検出することができる。

【0015】したがって、発光素子を配列孔の底部に反応ブロックと一緒に取り付けることにより熱の影響を受けて光量が変化するがあっても、濁度を正確に検出することができ、また、発光素子を反応ブロックと一緒に取り付けることができるため、その光軸合せも不要となる。

さらに、撮像カメラは、全サンプルチューブが視野に入る位置に配するだけでもよく、その画像を見るだけで設置位置が適正であるか否かを極めて容易に確認す

ることができるので、カメラの正確な光軸合せも一切不要になり、装置の組立てが簡素化される。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を図面に基づいて具体的に説明する。

図1は本発明に係る濁度測定装置を示す基本構成図である。図2は全体構成図、図3は画像データの検出エリアを示す説明図、図4は反応の進行に伴う画像変化を示す説明図、図5及び図6は画像処理の結果を示すグラフである。

【0017】濁度測定装置1は、サンプルチューブ2…内のサンプルの濁度を光学的に測定するもので、ハウジング3内に、サンプルチューブ2…を立てる複数の配列孔4…が一列に形成された2つの反応ブロック5R、5Lと、前記サンプルチューブ2を反応ブロック5R、5Lごとに撮像する2台の撮像カメラ6R、6Lが配され、前記撮像カメラ6R、6Lで撮像された画像データに基づき輝度分布又は色度分布に基づいて各サンプルの濁度を計測する演算処理装置7を備えている。

【0018】反応ブロック5R、5Lは、配列孔4…に立てられたサンプルチューブ2を所定の温度に維持するためのヒータHを備えると共に、各配列孔4に立てられた夫々のサンプルチューブ2に対して下から光を照射する発光素子（発光部）8が該配列孔4の底部に嵌め付けられている。

なお、発光部は、LEDなどの発光素子8に限らず、任意のものをしようすることができ、光ファイバの光出射端を配しておいても良い。

【0019】また、反応ブロック5R、5Lの側面には、撮像カメラ6R、6Lのレンズから夫々のサンプルチューブ2に向かう放射線上に夫々のサンプルチューブ2を撮像するための観察用透孔9が穿設されている。

なお、観察用透孔9は、撮像カメラ6R、6Lからサンプルチューブ2へ向かう光路を遮らないように形成されていれば、その形状は任意であり、例えば、反応ブロック5R、5Lの側面に水平方向のスリットを形成する場合でも良い。

【0020】撮像カメラ6R、6Lで撮像された画像データは演算処理装置7に入力されて、夫々のサンプルごとに濁度が計測される。

演算処理装置7では、図3に示すように、画像データGに各観察用透孔9を通してサンプルチューブ2が撮像される検出エリアA₁～A₈が設定され、夫々の検出エリアA₁～A₈のデータに基づいて個別に濁度を測定する。

【0021】LAMP法による遺伝子増幅を行う場合、サンプルの反応の進行に伴って遺伝子が増幅されるとピロリン酸マグネシウムが産生され、その産生量により白濁が進む。

図4(a)～(d)は、ピロリン酸マグネシウムに替えて、ポリスチレン粒子を純水に拡散させて白濁状態を作り出したサンプルにつき、濃度OD=0、0.02、0.2、0.4の4種類による画像変化を示す説明図である。

なお、濃度は、紫外光可視分光光度計を用いて測定したものである。

【0022】濃度OD=0のサンプルは、図4(a)に示すように、サンプルチューブ2の底部に溜まっているサンプル内は一様に暗く、したがって観察用透孔9内のサンプル内は一様に暗い。

【0023】僅かに白濁を生じている濃度OD=0.02のサンプルは、図4(b)に示すように、発光素子8の光がサンプル内で僅かに散乱を起こし、サンプルチューブ2の中心線に沿って微かに光の散乱が観察され、その部分が少し明るくなる。

【0024】白濁がかなり進行している濃度OD=0.2のサンプルは、図4(c)に示すように、発光素子8の光がサンプル内で散乱を起こし、サンプルチューブ2の中心線に沿って観察される高輝度部分も太くなっている。

そして、サンプル全体が白濁化した濃度OD=0.4のサンプルは、図4(d)に示すように、中央部の高輝度部分が全体に広がっている。

【0025】これより、例えば、画像処理により各検出エリアA₁～A₈の輝度分布データを取得し、それぞれの画像中の最高輝度の50%の輝度を閾値としてそれより高い輝度部分の形状を抽出させれば、その形状は図5(a)～(d)のように変化する。

ここで、その形状の面積Sを濁度として定義したり、他の方法で測定した濁度と面積Sの関係をデータ化しておけば、検出された面積Sに基づいて、濁度を算出できる。

したがって、その面積Sに応じて濁度を測定し、その濁度が予め設定された値に達した時点で反応終了を知らせるランプを点灯させたり、チャイムを鳴らせば良い。

このとき、輝度を直接のパラメータとして濁度測定をしているのではなく、輝度分布に基づいて濁度測定をしており、これによれば、発光素子8の光量が多少変化するようなことがあっても正確に濁度を測定できることが確認できた。

さらに、サンプルチューブ2に曇りや気泡があったとしても、全体の輝度分布には大きく影響しないので、これらが原因で測定を誤ることもない。

【0026】また、画像処理により水平方向の輝度分布を取得し、最高輝度を100%として正規化すれば、そのグラフは、図6(a)～(d)に示すようになる。

ここで、正規化された輝度70%の閾値より高輝度部分の幅を輝度70%幅Wとし、これを濁度として定義したり、又は、他の方法で測定した濁度と輝度70%幅Wの関係をデータ化しておけば、検出された輝度70%幅Wに基づいて、濁度を算出できる。

そして、このようにして測定された濁度が、予め設定された値に達した時点で反応終了を知らせるランプを点灯させたり、チャイムを鳴らせば良い。

この場合も、輝度を直接のパラメータとして濁度測定をしているのではなく、輝度分布に基づいて濁度測定をしており、これによれば、発光素子8の光量が多少変化するようなことがあっても正確に濁度を測定できることが確認できた。

また、サンプルチューブ2に曇りや気泡があった場合も、前述同様、これらが原因で測定を誤ることがない。

【0027】なお、上述の説明では、輝度分布に基づいて濁度を測定する場合についてのみ説明したが、輝度分布に変えて、RGB信号などに基づく色度分布により濁度を測定する場合も同様である。

すなわち、白濁・白沈を生ずれば、発光素子8の光が散乱光として検出されるので、高輝度部分に対応する部分はその色度が高くなる。

したがって、輝度分布に替えて色度分布に基づき、前述と同様に濁度を測定することができる。

【0028】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、観察用透孔を介して撮像されるサンプルチューブの画像データから得られる輝度分布又は色度分布に基づき、濁度を判定するようにしたので、サンプルチューブを照らす光量が多少変化するようなことがあっても、画像処理を施して閾値を適当に選んだり正規化することにより、光量変化による影響を排除することができ、また、サンプルチューブに疊りや気泡があったとしても全体の輝度分布には大きく影響せず、白濁・白沈の進行状況を正確に検出することができるという大変優れた効果を奏する。

また、撮像カメラは、観察しようとするサンプルチューブが視野に入る位置に設置すれば足り、設置位置が適正であるか否かもその画像を見るだけで極めて容易に確認することができるので、面倒な光軸合せが一切不要になり、装置の組立てを簡素化することができるという大変優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る濁度測定装置を示す基本構成図。

【図2】全体構成図。

【図3】画像データの検出エリアを示す説明図。

【図4】反応の進行に伴う画像変化を示す説明図。

【図5】画像処理の結果を示すグラフ。

【図6】画像処理の結果を示すグラフ。

【図7】従来装置を示す説明図。

【符号の説明】

- 1濁度測定装置
- 2サンプルチューブ
- 3ハウジング
- 4配列孔
- 5 R、5 L反応ブロック
- 6 R、6 L撮像カメラ
- 7演算処理装置

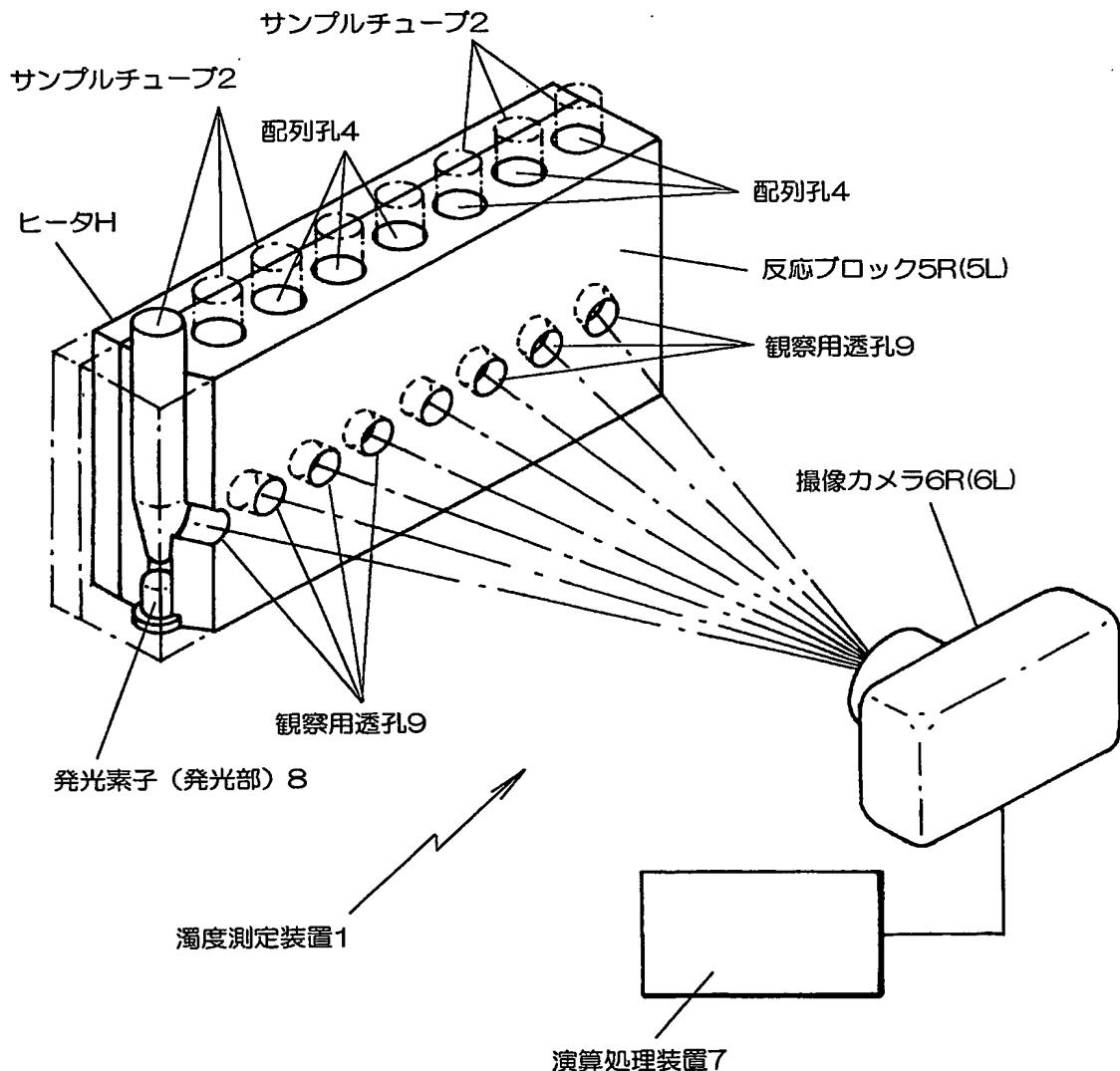
8発光素子（発光部）

9観察用透孔

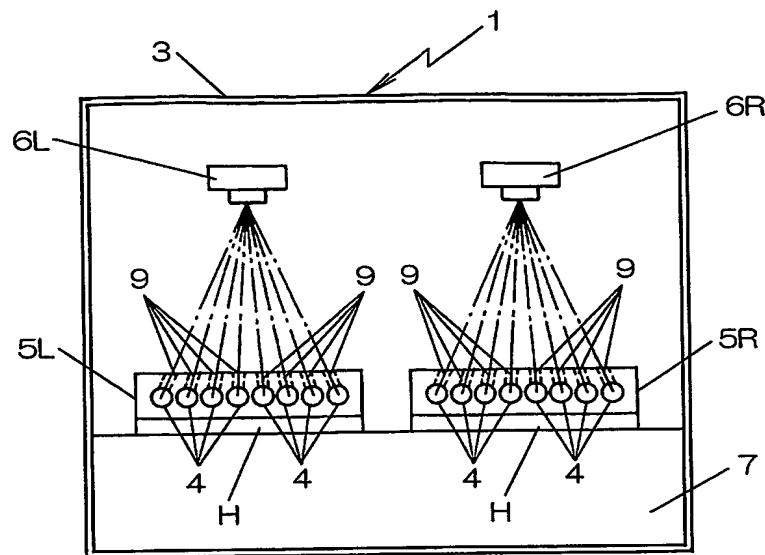
Hヒータ

【書類名】 図面

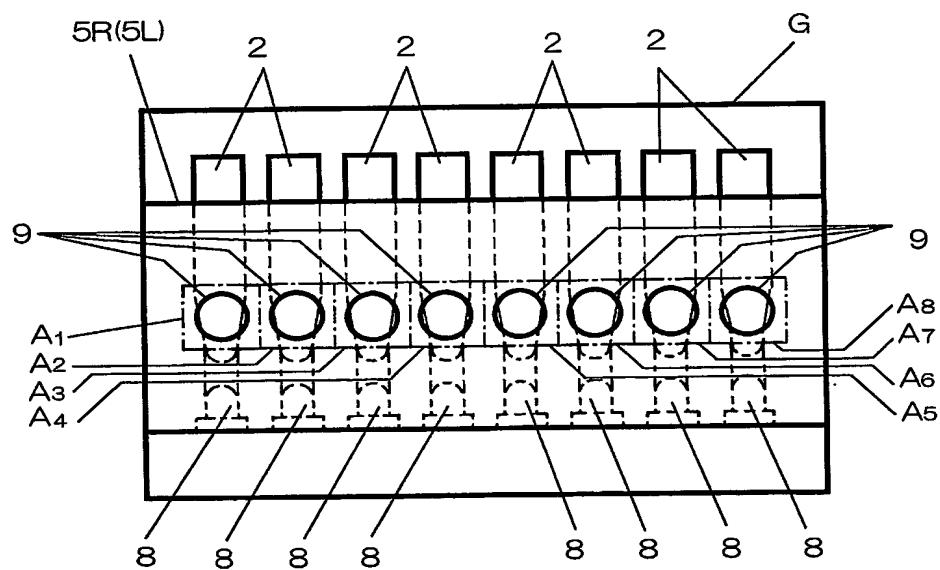
【図1】



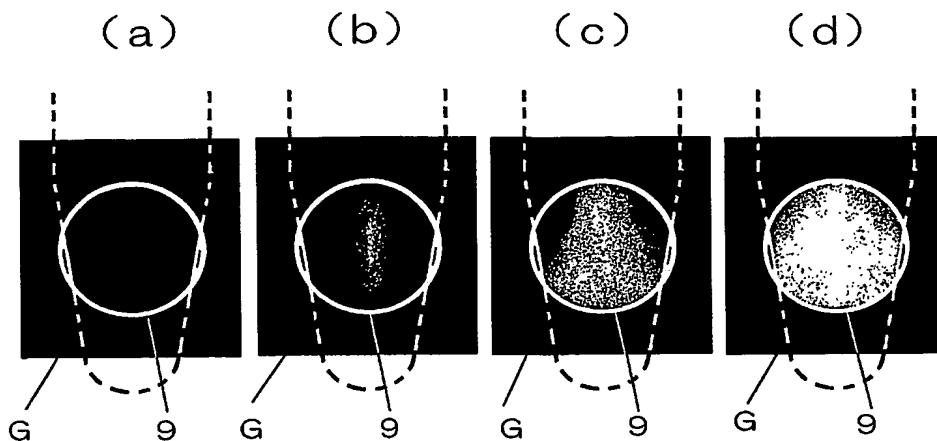
【図2】



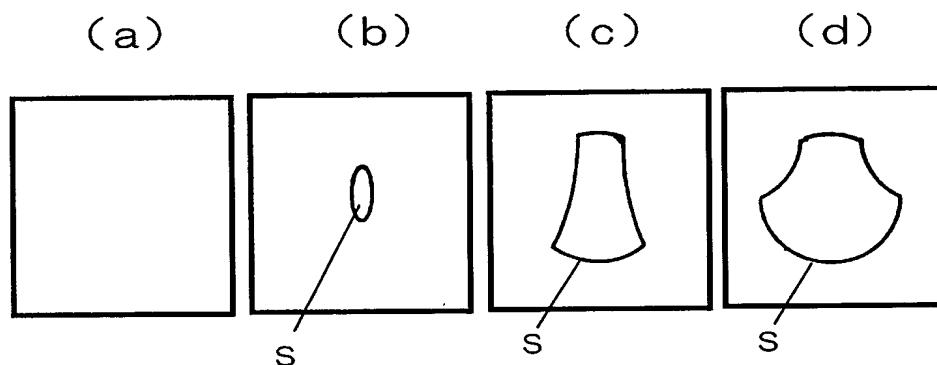
【図3】



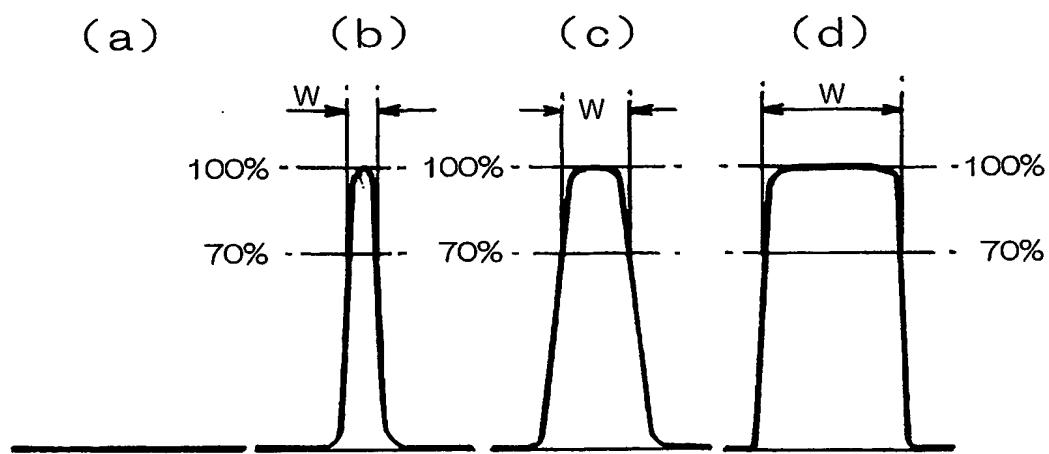
【図4】



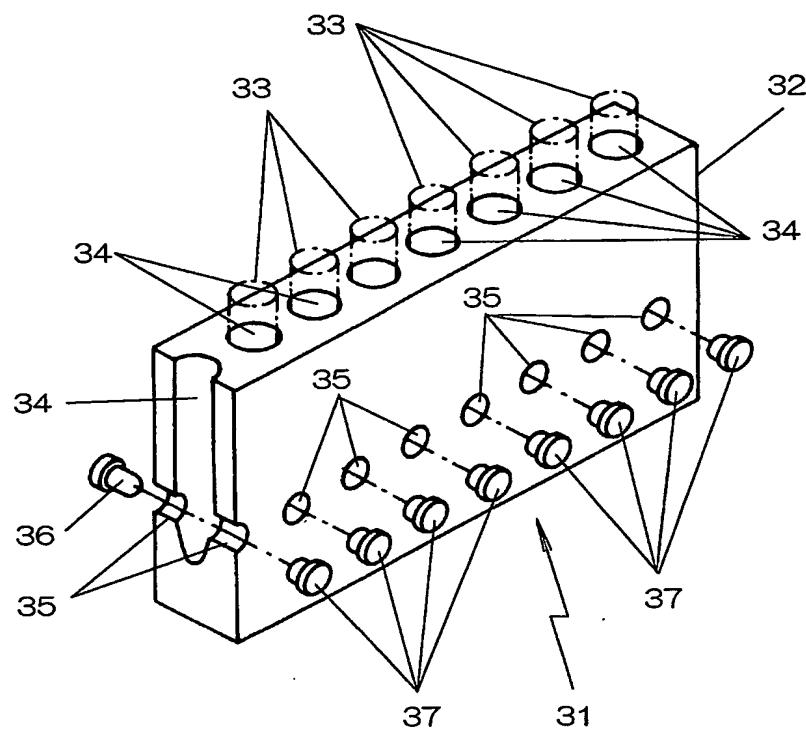
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】要約書**【要約】**

【課題】サンプルの濁度を光学的に測定する際に、発光素子の光量変化や、サンプルチューブ内の疊りや気泡に關係なく、サンプルの反応に伴って生じた白濁・白沈の有無を正確に検出でき、各光学素子の正確な光軸合せを不要にして、組立作業も簡単にできるようにする。

【解決手段】サンプルチューブ（2）を立てる複数の配列孔（4…）が一列に形成されると共に、各配列孔（4）の下から夫々のサンプルチューブ（2）に対して光を照射する発光部（8）が設けられた反応ブロック（5R、5L）と、夫々のサンプルチューブ（2）を反応ブロック（5R、5L）の側面に形成された観察用透孔（9）を通して撮像する撮像カメラ（6R、6L）と、撮像カメラ（6R、6L）で撮像された画像データから読み取られる輝度分布又は色度分布に基づき各サンプルの濁度を計測する演算処理装置（7）とを備えた。

【選択図】図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-120649
受付番号	50300691011
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 4月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月24日
-------	-------------

次頁無

出証特2004-3047259

特願 2003-120649

出願人履歴情報

識別番号 [000138200]

1. 変更年月日 1993年10月18日

[変更理由] 住所変更

住所 東京都渋谷区神宮前3丁目1番14号

氏名 株式会社モリックス